

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-505054

(43)公表日 平成9年(1997)5月20日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 48/00	A A B	9051-4C	A 6 1 K 48/00 A A B
A 0 1 K 67/027		8502-2B	A 0 1 K 67/027
A 6 1 K 35/30		9283-4C	A 6 1 K 35/30
38/00	A A M	9637-4B	C 1 2 P 21/02 C
38/22		9051-4C	A 6 1 K 37/02 A A M
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平7-513971	(71)出願人	ザ・トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバー シティ・オブ・ペンシルバニア アメリカ合衆国ペンシルバニア州19104- 3147, フィラデルフィア, マーケット・ス トリート 3700, スウィート 300
(86)(22)出願日	平成6年(1994)11月9日	(72)発明者	リー, ヴァージニア アメリカ合衆国ペンシルバニア州19147, フィラデルフィア, サウス・フィフス・ス トリート 776
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)5月9日	(74)代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外6名)
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 4 / 1 2 8 9 9		
(87)国際公開番号	W O 9 5 / 1 2 9 8 2		
(87)国際公開日	平成7年(1995)5月18日		
(31)優先権主張番号	0 8 / 1 5 0 , 3 6 8		
(32)優先日	1993年11月9日		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(81)指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP, US		

(54)【発明の名称】 均質なニューロン細胞移植片としての組成物とこれらの移植片の製造及び使用方法

(57)【要約】

安定で、均質な有糸分裂後ヒトニューロンを個体の脳に移植することを含む、中枢神経系の疾患、症状又は障害に罹患していると疑われる個体の治療方法を開示する。

安定で、均質な有糸分裂後ヒトニューロンを神経損傷の部位に又は当該部位の近くに移植することを含む、神経損傷を特徴とする損傷、疾患、症状又は障害に罹患したと疑われる個体の治療方法。安定で、均質な有糸分裂後ヒトニューロンと、薬剤学的に受容される培地とを含む薬剤組成物を開示する。安定で、均質な有糸分裂後ヒトニューロンを非ヒト動物の脳に移植することを含む、ヒト CNS 疾患、症状又は障害の非ヒト動物モデルの作製方法を開示する。それらの脳に移植された、安定で、均質な有糸分裂後ヒトニューロンを含む非ヒト動物を開示する。

【特許請求の範囲】

1. 中枢神経系の疾患又は障害に罹患していると疑われる個体の治療方法であって、

少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを前記個体の脳に移植する工程を含む方法。

2. 前記ニューロンが分化したNT2N細胞である、請求項1記載の方法。

3. 前記ニューロンが外因的遺伝物質によってトランスフェクトされたトランスフェクト済み分化NT2N細胞であり、トランスフェクト済み分化細胞が前記外因的遺伝物質のコーディング配列を発現して、タンパク質産物を産生する、請求項1記載の方法。

4. 前記外因的遺伝物質が神経伝達物質と、例えば神経成長因子、脳誘導神経栄養因子(BDNF)、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)及びグリア誘導成長因子のような、神経栄養物質とから成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項3記載の方法。

5. 前記中枢神経系疾患又は障害がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチングトン病、発作及び神経損傷から成る群から選択される、請求項1記載の方法。

6. 少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルと、薬剤学的に受容される培地とを含む薬剤組成物。

7. 前記ニューロンが分化したNT2N細胞である、請求項6記載の薬剤組成物。

8. 前記ニューロンが外因的遺伝物質によってトランスフェクトされたトランスフェクト済み分化NT2N細胞であり、トランスフェクト済み分化細胞が前記外因的遺伝物質のコーディング配列を発現して、タンパク質産物を産生する、請求項6記載の薬剤組成物。

9. 前記外因的遺伝物質が神経伝達物質(例えば、チロシンヒドロキシラーゼ)と、例えば神経成長因子、脳誘導神経栄養因子(BDNF)、塩基性繊維芽

細胞成長因子（bFGF）及びグリア誘導成長因子のような、神経栄養物質とから成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項6記載の薬剤組成物。

10. 中枢神経系疾患又は障害の非ヒト動物モデルの作製方法であって、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを前記非ヒト動物の脳に移植する工程を含む方法。

11. 前記ニューロンがNT2N細胞である、請求項10記載の方法。

12. 前記ニューロンが外因的遺伝物質によってトランスフェクトされたトランスフェクト済み分化NT2N細胞であり、トランスフェクト済み細胞が前記外因的遺伝物質のコーディング配列を発現して、タンパク質産物を産生する、請求項10記載の方法。

13. 前記外因的遺伝物質が正常及び突然変異アミロイド先駆体、キナーゼ、ホスファターゼ、正常及び突然変異スーパーオキシドジスムターゼ、ニューロフィラメントタンパク質並びにアポリポタンパク質4から成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列を含む請求項10記載の方法。

14. 前記疾患又は障害がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、発作及び神経損傷から成る群から選択される、請求項10記載の方法。

15. 前記動物が齧歯類である請求項10記載の方法。

16. 前記動物が免疫適格齧歯類であり、前記細胞の移植前、中及び／後に前記齧歯類にシクロスポリンを投与する工程をさらに含む請求項10記載の方法。

17. 非ヒト動物の脳に移植された、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを含む非ヒト動物。

18. 前記ニューロンがNT2N細胞である、請求項17記載の非ヒト動物。

19. 前記ニューロンが外因的遺伝物質によってトランスフェクトされたNT2N細胞であり、トランスフェクト済み細胞が前記外因的遺伝物質のコーディング配列を発現して、タンパク質産物を産生する、請求項17記載の非ヒト動物。

。

20. 前記外因的遺伝物質が正常及び突然変異アミロイド先駆体、キナーゼ、ホスファターゼ、正常及び突然変異スーパーオキシドジスムターゼ、ニューロフィラメントタンパク質並びにアポリポタンパク質4から成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列を含む請求項19記載の非ヒト動物。

21. 神経損傷を特徴とする損傷、疾患又は障害に罹患していると疑われる個体の治療方法であって、

少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを前記神経損傷の部位に又はこのような部位の近くに移植する工程を含む方法。

22. 前記ニューロンが分化したNT2N細胞である、請求項21記載の非ヒト動物。

23. 前記損傷が脊髄損傷であり、前記サンプルを前記個体の脊柱に移植する、請求項21記載の方法。

24. 前記損傷が運動ニューロンの損傷である、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】均質なニューロン細胞移植片としての組成物とこれらの移植片の製造及び使用方法発明の分野

本発明は、ヒトの疾患、症状及び障害を研究するために有用な、非ヒト動物モデルを作製するために、安定で均質なニューロン細胞集団を非ヒト動物に移植するために有用な組成物及び移植方法に関する。本発明は、個体の身体における疾患、症状及び障害、特に、脳の損失、損傷及び機能障害及び／又は他の部位における個体ニューロンの損失、損傷及び機能障害を治療又は予防するために個体中に安定で均質なニューロン細胞集団を移植するために有用な組成物及び移植方法に関する。この出願は米国特許出願第08/150,368号（1993年9月9日出願）、米国特許出願第08/170,668号（1993年12月17日出願）、米国特許出願第07/911,980号（1992年7月10日出願）、及び米国特許出願第07/780,715号（1991年10月21日出願、現在、米国特許第5,175,103号、1992年12月29日発行）に関係し、これらの出願は本発明に援用される。本発明はN I H助成金第N I H 1 8 6 1 6 号によって支援される研究の過程でなされた。合衆国政府は本発明にある一定の権利を有する。

発明の背景

中枢神経系（C N S）細胞の主要な部類（すなわち、ニューロン、星状膠細胞）又はC N S組織フラグメントの移植は、これらの細胞の発達生物学及び免疫学的性質を研究し、例えばアルツハイマー病のようなC N S疾患の動物モデルを作製し、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、筋萎縮性側索硬化症及び遺伝性脊髄性運動失調のような、厳しい進行性の神経変性障害を治療するための代替え方法を開発し、並びにこのような疾患、状態及び障害に罹患していると疑われる個体を治療するために個体中にニューロン細胞を移植することを含めて、ニューロンの損失、損傷又は機能障害を特徴とする他の疾患、状

態及び障害を研究する機会を提供する。薬物誘導性及び突発性パーキンソン病の錐体外路発現を改善するためにヒト胎児中脳組織移植片を用いる最近の先駆的試みは、移植されたヒトCNS組織がヒト神経変性疾患を治療する可能性を強調している [Freed, C. A. 等, 1992, New Engl. J. Med. 327:1549~1555; Spencer, D. D. 等, 1992, New Engl. J. Med. 327:1541~1548; 及びWidner, H. 等, 1992, New Engl. J. Med. 327:1556~1563]。しかし、これらの試みの結果は完全に満足できるものではなかった。

温度に敏感なプロモーターを含む構造体(construct)を用いたCNS前駆細胞の不変化(immortalization)は、ニューロン及びグリアの遺伝子工学先駆体(genetically engineered precursor)の移植を可能にしているが、これらの先駆体の脳移植片はグリア及びニューロンの子孫(progeny)の混合集団を生じている (Cattaneo, E. とR. McKay, 1991, TINS, 14:338~340; Renfranz, R. J. 等, 1991, Cell, 66:713~729; Snyder, E. Y. 等, 1992, Cell, 68:33~51)。代替え方法は、CNSの腫瘍から得られたニューロン様形質転換細胞ラインを用いることであったが、腫瘍性ニューロン様細胞はこの細胞サイクルを永久的に出るように誘導されることができない、又はこれらの細胞は齧歯類脳に移植されたときに腫瘍に発達する (Fung, K. F. 等, 1992, J. Histochem. Cytochem. 40:1319~1328; Trojanowski, J. Q. 等, 1992, Molec. Chem. Neuropathol. 17:121~135; 及びWiestler, O. D. 等, 1992, Brain Pathol. 2:47~59)。片側巨大脳症を有する小児から得られた、徐々に分裂するヒトニューロン細胞ラインが培養中にニューロン様表現型を示すことが判明したが、齧歯類CNSにおける、これらの細胞の移植片はニューロン及び間葉の混合表現型性質を示した (Poltorak, M. 等, 1992, Cell Transplant 1:3~15)。

このような動物の脳にニューロンを移植して、CNS疾患、症状若しくは障害

に類似するか又はこれらを模倣する状態を生じることによる、CNS疾患及び障害の動物モデルの作製方法が必要とされている。

このような動物の脳にニューロンを移植して、CNS疾患、症状若しくは障害に類似するか又はこれらを模倣する状態を生じることによる、CNS疾患及び障害の動物モデルが必要とされている。

その存在が治療すべき疾患に関係した病理学を逆転若しくは予防するような細胞を補充若しくは導入するためにニューロンを移植することによる、CNS疾患、症状又は障害に罹患していると疑われる個体の治療方法が必要とされている。

発作又は損傷によって損なわれた細胞を補充するためにニューロンを移植することによる、例えば、頭外傷、神経傷害又は脊髄損傷のような発作又は損傷によって生ずるニューロン障害に罹患していると疑われる個体の治療方法が必要とされている。

発明の概要

本発明は、ニューロンの損傷又は損失を特徴とする疾患、症状又は障害に罹患していると疑われる個体の治療方法であって、少なくとも95%純粋で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物 (culture) からのサンプルを損傷又は損失の部位において若しくはこのような部位の近くにおいて個体に移植することを含む方法に関する。

本発明は、中枢神経系の損傷、疾患、症状又は障害に罹患していると疑われる個体の治療方法であって、少なくとも95%純粋で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを個体の脳に移植することを含む方法に関する。

本発明は、脊髄の損傷、疾患、症状又は障害に罹患していると疑われる個体の治療方法であって、少なくとも95%の純度で、安定、均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを個体の脊柱に移植することを含む方法に関する。本発明は、神経細胞の損傷、疾患、症状又は障害に罹患していると疑われる個体の治療方法であって、95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを個体の身体中に神経機能障害又は損傷の

部位において移植することを含む方法に関する。

本発明は、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルと、薬剤学的に受容される媒質とを含む薬剤組成物に関する。

本発明は、中枢神経系のヒト疾患又は障害の非ヒト動物モデルの作製方法であって、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを非ヒト動物に移植することを含む方法に関する。

本発明は、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを、その脳、神経系又は脊柱に移植された非ヒト動物に関する。

図面の説明

図1A、図1B、図1C、図1D、図1E、図1F、図1G及び図1Hは、種々なモノクローナル抗体によって検査した、移植後4週間目の海馬状隆起（歯状回と多形細胞層(polymorph layer)）中のNT2N移植片の顕微鏡写真を含む。

図2A、図2B、図2C及び図2Dは、クレシルバイオレット(Cresyl Violet)で染色した（図2A、図2C及び図2D）又はマクロファージに対してMAb(ED1)によって染色した（図2B）、移植後2～4週間目の皮下白質と背側間葉（図2C）とにおける3種類のNT2N移植片の顕微鏡写真を含む。

図3A、図3B、図3C、図3D、図3E、図3F、図3G及び図3Hは、MAbによって検出し、ヘマトキシリンによって対比染色した移植後4週間目の皮下白質中のNT2N移植片の顕微鏡写真を含む。

発明の詳細な説明

本発明は、損傷、疾患、障害若しくは症状に罹患していると疑われる個体中に、若しくは非ヒト動物中にニューロンを移植して、ヒト疾患、障害若しくは症状の非ヒト動物モデルを作製することに関する、組成物及び方法に関する。本発明の方法に用いられるニューロンは少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンである。任意に、ニューロンは外因的な遺伝物質(genet

ic material)を含むことができる。本発明の方法に用いられるニューロンは遺伝子型的に及び表現型的に均質である。

本明細書で用いるかぎり、“サンプル”なる用語は1個以上の細胞を表す意味である。好ましい実施態様では、サンプルは複数の細胞を含む。本発明によると、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを非ヒト動物又はヒトに移植する。したがって、本発明の方法は、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを非ヒト動物又はヒトに移植することに関する。

本明細書で用いるかぎり、“前記神経損傷の部位において又はこのような部位の近くにおいて”なる用語は、破壊、損傷若しくは機能障害した神経細胞を置換するために及び／又は破壊、損傷若しくは機能障害した神経細胞に起因する機能を修復するために、神経細胞を移植する位置を意味する。この位置は、このような移植された細胞が破壊、損傷若しくは機能障害した神経細胞に代わる置換細胞として発達し、破壊、損傷若しくは機能障害した神経細胞によって失われた機能を修復するために必要な結合を形成することができる部位として定義される。

本明細書で用いるかぎり、“外因的な遺伝物質”なる用語は、細胞又は原型(ancestor)細胞中に導入される、ゲノムDNA、cDNA、合成DNAとRNA、mRNA及びアンチセンスDNAとRNAを意味する。外因的な遺伝物質は不均質でよい、又は個体若しくは動物に通常見い出される遺伝物質の1種以上の付加的なコピーであることができる。ヒトの損傷、疾患、症状又は障害の治療方法に薬剤組成物の成分として細胞を用いる場合には、細胞を形質転換しするために用いられる外因的遺伝物質が個体を治療するために及び／又は細胞をより移植されやすくするために用いられる治療法として選択されるタンパク質をコードすることができる。細胞をヒトCNS疾患又は障害の非ヒト動物モデルの作製方法に用いる場合には、細胞に導入される外因的遺伝物質が、モデル化すべきCNS疾患、症状又は障害に罹患したヒトの症状に類似した又はこのような症状を模倣した状態を非ヒト動物に生じるために選択されたタンパク質をコードすることができる。

外因的遺伝物質は、発現ベクターを細胞にトランスフェクトする場合に、外因的遺伝物質がその細胞内に発現されることができるよう、本質的な調節配列(regulatory sequences)に機能的に結合した、細胞による産生が望ましいタンパク質のコーディング領域を含む発現ベクターで供給することが好ましい。

本発明の幾つかの実施態様によると、純粋で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルをCNS損傷、疾患、症状又は障害に関して治療される個体に移植する。これらの細胞は、損傷した、死亡した、非機能的又は機能障害的な内因的細胞の代わりに本質的に置換する及び／又は機能する。このように、例えば神経損傷又は脊髄損傷に関連した疾患のような、ニューロンの損失、損傷又は機能障害を特徴とする損傷、疾患、症状又は障害に罹患した個体の場合には、移植された細胞が損失、損傷若しくは機能障害した細胞の代わりに機能することができ、及び／又は個体において内因的に産生される産物の欠乏により低下若しくは損失された正常な機能を改良若しくは修復するために必要な、このような産物を産生することができる、個体の部位に細胞を移植する。脳におけるニューロンの損失、損傷又は機能障害を特徴とする損傷、疾患、症状又は障害に罹患した個体の場合には、個体の脳に細胞を移植する。移植された細胞は損失、損傷若しくは機能障害した細胞の代わりに機能し、及び／又は個体において内因的に産生される産物の欠乏により低下若しくは損失された正常な脳機能を改良若しくは修復するために必要な、このような産物を産生することができる。

本発明の幾つかの実施態様によると、所望の産物を産生する生存ニューロンを供給するために、純粋で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを疾患、症状又は障害に関して治療される個体に移植する。移植された細胞は、治療される個体の移植部位に又はこの移植部位の近くに存在する場合に、治療される疾患、症状又は障害に関連した病理学を逆転又は予防する特定の産物を産生することができる。

本発明の幾つかの実施態様によると、ヒトのCNS疾患、症状又は障害のモデルを作製するために、純粋で、安定かつ均質な有糸分裂後のヒトニューロンの培養物からのサンプルを非ヒト動物に移植する。移植された細胞は、CNS疾患又

は症状の病理学に類似する又はこのような病理学を模倣する症状の発現を生じる産物を産生することができる。

この方法を用いて、内因的細胞の損失、損傷又は機能障害を特徴とする損傷、疾患、症状又は障害に罹患した個体を治療することができる。この方法を用いて、ニューロン損傷又は死亡に関連した、発作、脊髄損傷又は他の損傷、症状又は障害に罹患した個体を治療することができる。本発明の方法の実施によって治療することができるCNS疾患及び障害には、内因的細胞の損失、損傷又は機能障害を特徴とする任意の疾患であって、このような細胞に置換することができ、かつ適当な機能のために必要な又は正常でなく存在する若しくは異常なレベルで存在する化合物の存在を中和する(counteract)するために必要な産物を産生することができるニューロンを供給することによって、その症状が逆転されるか又は重症度を軽減される疾患がある。本発明は例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、筋萎縮性側索硬化症及び遺伝性脊髄性運動失調のような、進行性の神経変性障害並びに、例えば発作及び神経損傷のような、神経症状(neurological condition)の治療に有用である。本発明は、適当な脳機能のために必要な有効タンパク質及び他の有効化合物を産生し、伝搬するための供給系(delivery system)として役立つことによって疾患の治療に有用である。

内因的細胞の損失、損傷又は機能障害を特徴とする、損傷、疾患、症状又は障害に罹患した個体を治療するために有用な、本発明による薬剤組成物は純粋で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルと、薬剤学的に受容される媒質とを含む。本発明に用いられるニューロンは少なくとも95%の純度である、有糸分裂後ヒトニューロンの安定で均質な培養物でなければならない。本発明に用いられるニューロンは外因的遺伝物質によってトランスフェクトされることができる。

細胞の形質転換に用いられる外因的遺伝物質は、治療される個体の脳に供給するための治療法として選択されるタンパク質をコードすることができる。トランスフェクトされる遺伝物質によってコードされるタンパク質産物には、限定する訳ではなく、神経伝達物質の産生を生じるもの（例えば、チロシンヒドロキシラ

ーゼ)並びに、例えば神経発育因子(NGF)、脳誘導神経栄養因子(BDNF)、塩基性繊維芽細胞(bFGF)及びグリア誘導成長因子(GDNF)のような、神経栄養物質がある。さらに、例えばP53及びトロポスポンジンのような、腫瘍抑制遺伝子を細胞に導入することができる。

本発明の他の実施態様によると、ヒトのCNS疾患、症状又は障害の非ヒト動物モデルを作製するために、非ヒト動物の脳に、純粋で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを移植する。これらの細胞の存在は、動物の脳に変化をもたらし、動物はヒトのCNS疾患、症状又は障害に類似する又はこれらを模倣する特徴を発生するようになる。移植された細胞は、動物の脳に存在する場合に、モデル化された疾患に関連した病理学に類似する又はこのような病理学を模倣する症状をもたらし、特定の産物を産生する。CNS疾患の治療に有用な、本発明による非ヒト動物モデルの作製に用いられる細胞は、純粋で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルと、薬剂的に受容される媒質とを含む。本発明に用いられるニューロンは少なくとも95%の純度である、有糸分裂後ヒトニューロンの安定で均質な培養物でなければならない。

本発明の方法の実施によってモデル化することができるCNS疾患及び障害には、内因的細胞の死亡、非機能化又は機能障害を特徴とするCNSの任意の疾患、特に、細胞に正常に関連しないタンパク質を産生する又は異常なレベルで正常タンパク質を産生する細胞を特徴とする疾患がある。したがって、ヒトCNS疾患に関連したタンパク質を産生する細胞を動物の脳に移植すると、モデル化された疾患又は障害の病理学に関連した特徴に類似する又はこのような特徴を模倣する症状が生ずる。本発明は、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンテイングトン病、筋萎縮性側索硬化症、遺伝性脊髄性運動失調並びに運動ニューロン疾患及びレーヴィ小体疾患のような、進行性の神経変性障害の非ヒト動物モデルを作製するために有用である。これらの疾患には、例えば正常及び突然変異アミロイド先駆体遺伝子、遺伝子をコードするキナーゼ、ホスファターゼ、正常及び突然変異スーパーオキシドジスムターゼ、ニューロフィラメントタンパク質並び

にアポリポタンパク質4のような、多様な遺伝子が関与する。さらに、ある種類の癌の原因となる特定の癌遺伝子を導入して、NT2誘導細胞を用いて、このような癌の動物モデルを作製することができる。

本発明の幾つかの実施態様では、用いるニューロンを米国特許第5,175,103号(1992年12月29日発行)に記載の方法によって製造することができ、この特許は、レチノイン酸(RA)によるNT2細胞の処理後に、ヒト奇形癌細胞ライン(NTera2/クローンPI又はNT2細胞と名付ける)から>95%純粋な有糸分裂後ヒトニューロン(NT2N細胞と名付ける)を得る方法を開示する。インビトロにおけるニューロンの、広範囲な生化学的、分子生物学的及び形態学的研究のためにモデル系を形成する他に、CNS疾患及び障害の動物モデルを作製するために純粋なヒトニューロンの安定で均質な集団をインビボ移植片として用いることができる、又は個体を悩ますCNS疾患若しくは障害に関連した病理学を逆転若しくは予防する産物を産生することができるニューロンを導入する治療法/予防法として、CNS疾患若しくは障害に罹患した個体の脳に、純粋なヒトニューロンの安定で均質な集団をインビボ移植片として用いることができる。

NT2細胞はその子孫がニューロン系統に限定される前駆細胞に相当すると思われるので、NT2細胞ラインは、ニューロン、グリア及び間葉細胞に分化することができる他の全ての奇形癌細胞ラインの中でも特有である(Abramham, I. 等, 1991, J. Neurosci. Res. 28:29~39; Andrews, P. W. 等, 1981, Tissue Antigens 17:493~500; Andrews, P. W. 等, 1984, 1984 Lab. Invest. 50:147~162; Andrews, P. W. 等, 1987, Devel. Biol. 103:285~293; Kleppner, S. R. 等, 1992, Soc. Neurosci. Abst. 18:782; Lee, V. M. -Y. とP. W. Andrew, 1986, J. Neurosci. 6:514~521; 及びYoukin, D. P. 等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:2174~2178)。NT2N

細胞の他の特性化は、これらの細胞がCNSニューロンに非常に密接に類似することを示している（Pleasure, S. J. と V. M. -Y. Lee. 1993, J. Neurosci. Res. 印刷中; Pleasure, S. J. 等, 1992, J. Neurosci. 12:1802~1815）。NT2N細胞はCNSニューロンの他の重要な性質を有する、すなわち、これらの細胞は695アミノ酸長さのアミロイド先駆体タンパク質（APP）を殆ど排他的に発現し、アルツハイマー病アミロイドプラークに見い出される β -アミロイド又はA4（ β /A4）ペプチドを産生し、分泌し、それらの細胞表面にグルタメート受容体チャンネルを有する。

本発明に用いられるニューロンは外因的遺伝物質によってトランスフェクトされることができる。米国特許第5, 175, 103号に記載される通りに形成される場合に、本発明に用いられるニューロンは分化の誘導前に遺伝物質によってトランスフェクトされることができる。トランスフェクション方法は周知であり、上記特許に開示される。細胞の形質転換に用いられる外因的遺伝物質は、脳の細胞内のその存在がヒトの疾患、障害又は症状に関連するタンパク質をコードすることができる。トランスフェクトされる遺伝物質によってコードされるタンパク質産物には、限定する訳ではなく、正常及び突然変異アミロイド先駆体、キナーゼ、ホスファターゼ、正常及び突然変異スーパーオキシドジスムターゼ、ニューロフィラメントタンパク質及びアポリポタンパク質4並びに神経伝達物質（例えば、チロシンヒドロキシラーゼ）及び、例えば神経発育因子（NGF）、脳誘導神経栄養因子（BDGF）、塩基性繊維芽細胞（bFGF）及びグリア誘導成長因子（GDGF）のような、神経栄養物質がある。

細胞をトランスフェクトするために用いられる外因的遺伝物質は好ましくは、トランスフェクトされる遺伝物質が細胞内に発現されることができるよう、コーディング配列に機能的に結合した本質的な調節配列を含むベクターとして供給される。

外因的遺伝物質をコードする発現ベクターは、遺伝子発現のために必要な調節要素に機能的に結合した、産生されるべきタンパク質をコードするヌクレオチド

配列を含む。したがって、ニューロン細胞中へのDNA又はRNA分子の組込みはタンパク質をコードするDNA又はRNAの発現を生じ、したがって、タンパク質の産生を生じる。

調節要素に機能的に結合した、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む外因的遺伝物質は機能性エピソーム分子として細胞中に存在して留まることができるか、又は細胞の染色体DNAに統合されることができる。外因的遺伝物質は細胞に組み込まれることができ、そこでプラスミドの形状の分離した遺伝物質として留まる。或いは、染色体に組み込まれることができる線状DNAを細胞に導入することができる。DNAを細胞中に導入する場合に、染色体中へのDNA組込みを促進する試薬を加えることができる。組込みを促進するために有用であるDNA配列もDNA分子に含めることができる。或いは、RNAを細胞に導入することができる。

発現ベクターの必要な要素はタンパク質をコードするヌクレオチド配列と、細胞中にその配列を発現するために必要な調節要素とを含む。調節要素はタンパク質をコードするヌクレオチド配列に機能的に結合して、発現を可能にする。タンパク質をコードするヌクレオチド配列はcDNA、ゲノムDNA、合成DNA若しくはこれらのハイブリッド又は例えばmRNAのようなRNA分子であることができる。

遺伝子発現のために必要な調節要素は、プロモーター、開始コドン、停止コドン及びポリアデニル化シグナルを含む。これらの要素がニューロン中で機能しうることが必要である。さらに、ヌクレオチド配列がニューロン細胞中で発現されることができ、したがって、タンパク質が産生されることができるよう、これらの要素がタンパク質をコードするヌクレオチド配列に機能的に結合することが必要である。

開始コドンと停止コドンは一般に、タンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部であると考えられる。しかし、これらの要素がニューロン中で機能的であることが必要である。

同様に、用いるプロモーターとポリアデニル化シグナルとはニューロン細胞内

で機能的でなければならない。

本発明の実施に有用なプロモーターの例には、限定する訳ではなく、サイトメガロウイルスプロモーター、特に、イミージェトアーリープロモーター(immediate early promotor)、SV40プロモーター及びレトロウイルスプロモーターがある。

本発明の実施に有用なポリアデニル化シグナルの例には、限定する訳ではなく、SV40ポリアデニル化シグナルがある。

何らかの理由で、移植細胞の除去が望ましい場合には、細胞破壊の標的として役立つ付加的要素を加えることができる。ヘルペスチミジンキナーゼ(tk)の発現可能な形を外因的遺伝物質に含めることができる。外因的遺伝物質をニューロン中に導入すると、tkが産生される。移植細胞を殺すことが望ましい又は必要である場合には、薬物のガングシクロヴィール(gangcyclovir)を個体に投与して、この薬物にtk産生細胞を選択的に殺害させる。このように、移植細胞の選択的破壊を可能にする系を形成することができる。

発現ベクター中の外因的遺伝物質を発現させるために、タンパク質をコードするヌクレオチド物質に調節要素が機能的に結合しなければならない。したがって、プロモーターとポリアデニル化シグナルとがコーディング配列を含むフレーム(frame)内にあることが必要である。タンパク質産生を最大にするために、ニューロン細胞内での遺伝子発現に十分に適した調節配列を選択することができる。さらに、細胞に最も効果的に転写されるコドンを選択することができる。当業者は外因的遺伝物質をニューロン中で機能的である発現ベクターとして製造することができる。

ニューロンの損傷又は損失を特徴とする損傷、疾患、症状又は障害に罹患していると疑われる個体中にこのようなニューロンの損傷又は損失の部位において、ニューロンの損傷又は損失の部位へのニューロンの直接移植によって、ニューロンを移植することができる。CNSの疾患、症状又は障害に罹患していると疑われる個体の脳に、このような個体の脳へのニューロンの直接移植によって、ニューロンを移植することができる。さらに、頭部外傷又は発作に罹患した個体の脳

にニューロンを移植することができる。脳中のニューロンを損傷、破壊又は機能障害させる疾患、症状、障害又は損傷に罹患していると疑われる又は同定される個体を、内因的(endogenous)ニューロンの破壊又は機能障害によるニューロン機能の損失を補充又は補償するためのニューロンの移植によって治療することができる。

幾つかの実施態様では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ ニューロンを移植する。幾つかの実施態様では、 $(5 \sim 10) \times 10^4$ ニューロンを移植する。ニューロンの移植には2方法が用いられており、第1方法はニューロン細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定手術(stereotaxic surgery)を含み、第2方法ではミクロ手術(microsurgery)によって細胞を脳に移植する。ニューロン組織の移植方法は、Backlund, E. O. 等, 1985, J. Neurosurg. 62:169~173; Lindvall, O. 等, 1987, Ann. Neurol. 22:457~468; 及びMadrazo, I. 等, 1987, New Engl. J. Med. 316:831~834に開示されており、これらの文献の各々は本明細書に援用される。

疾患又は傷害による神経損傷の部位に又はこのような部位の近くにおいて脊髄に、ニューロンを移植することができる。移植された細胞は運動ニューロンにさらに分化して、それによって損傷部位における神経を置換又は再結合させることができる。幾つかの実施態様では、脊髄の一部である運動ニューロンに損傷が生じる。また、幾つかの実施態様では、脊柱の外部の運動ニューロンに損傷が生じる。神経細胞損傷の部位に、すなわち、移植細胞の分化が個体の神経機能に代替える又は神経を再結合させて、損傷を治療或いは改善することができるような箇所における1個以上の損傷細胞の付近に、本発明のニューロンを移植する。移植位置から発生する突起(process)が損傷神経の突起に置換して、損傷神経ネットワークを修復することができるような位置にニューロンを移植する。

定位脳固定機器(stereotaxic instrument)と手で支える10mlハミルトン注射器(hamilton syringe)とを用いて、大脳半球(hemisphere)にニューロンを移植することによって、非ヒト動物の脳にニューロンを移植することができる。 $1 \times$

$10^3 \sim 1 \times 10^6$ ニューロンのアリコートを作成したラット及び新生仔ラットに移植する。幾つかの実施態様では、 $(5 \sim 10) \times 10^4$ ニューロンを移植する。成体ラットでは、各ラットの単一半球の1部位における大脳皮質、直下の白質又は海馬中に定位脳固定式(stereotaxically)に細胞を移植する。

本発明を下記実施例によってさらに説明するが、これらの実施例は限定を決して意図しないものである。

実施例

実施例 1

ヌードマウスの脳に移植したNT2N細胞の研究は、これらのNT2N細胞がニューロンとして免疫不全ヌードマウスの脳に組み込まれ、そこで拒絶又は腫瘍形成の兆候なしに>12月間生存することを示す。さらに、シクロスポリン処理した及び処理しない免疫適格Sprague-DawleyラットにおけるNT2Nニューロンの移植が実施され、細胞の生存が観察されている。

免疫適格動物へのトランスフェクト済みニューロン細胞の移植を示す実験の考察を下記に述べる。

材料と方法

NT2細胞の培養と、NT2Nニューロンの作製とを本質的に米国特許第5,175,103号に記載の通りに実施した。簡単に説明すると、NT2細胞を標準方法を用いて培養し、5%ウシ胎児血清とペニシリン/ストレプトマイシンを含むOptiMEM中で1週間に2回、1:3で継代培養した。NT2細胞を $10 \mu\text{m}$ レチノイン酸(RA)の投与によってニューロンに分化するように誘導し、レチノイン酸は1週間に2回、5週間にわたって補充し、この時点で細胞を再培養して(replated)、Replate 1細胞を確立した。次に、2回連続再培養操作(Replate 2及びReplate 3と名付ける)後に高度に分化したNT2N細胞が得られ、これらの時点においてNT2N細胞は>99%純粋であった。Replate 3 NT2Nニューロンの新たに回収されたアリコートを緩衝液中で3回洗浄してから、本明細書に述べる移植研究に用いた。

さらに、2ラットで実施した実験では、NT2N細胞の予め凍結したアリコー

トをCNSに移植する直前に解凍した。

ラット脳へのNT2N細胞の移植：

成体（170～280g）雌Sprague/Dawleyラットをケタミン（87mg/kg）とキシラジン（13mg/kg）との腹腔内移植によって麻酔して、手術の準備をし、定位脳固定機器（Kopf, Tujunga, CA）に入れた。新生仔（出生後5日目）雌Sprague/Dawleyラットを、定位脳固定機器と手で支える10mlハミルトン注射器とを用いた、1半球へのNT2N細胞の移植中に低体温法によって麻酔した。（5～10）×10⁴NT2N細胞のアリコート成体及び新生仔のラットに移植した。成体ラットでは、各ラットの単一半球の1部位における大脳皮質、直下の白質又は海馬中に定位脳固定式にNT2N細胞を移植した。この研究には、合計68匹のラットを用いた（表1参照）。

定位脳固定式移植部位はPellegrino等のシステムBを用いて決定して（Pellegrino, L. T. 等, 1979, 「ラット脳の定位固定アトラス」, Plenum Press, ニューヨーク）、全ての移植はNT2N細胞懸濁液2μlを5分間にわたって移植することによって実施した。移植後に、針をさらに5分間その場に残し、その後に徐々に取り出した。移植前に、NT2N細胞の生存能力(viability)をトリパンブルー排除法を用いて顕微鏡検査によって監視した。移植操作が完了した後に、移植されない、残りのNT2N細胞の生存能力を同様な操作を用いて監視した。

NT2N細胞を移植した成体ラットのサブセット（N=13）を、それらの移植後生残期間にわたって、シクロスポリン（7～10mg/kg/日）の経口投与（N=8；胃管を用いて）又は皮下投与（N=5）によって毎日処置した。

種々な移植後生残時間後に、ラットを深く麻酔し、リン酸塩緩衝化生理食塩水の灌流（赤血球と血清タンパク質との洗い落としのため）と、その後の70%エタノール及び150mM NaClの灌流とによって殺した。脳を取り出し、70%エタノール及び150mM NaCl中に一晚浸漬することによって固定した。移植後生残時間は、表1に要約するように、4日間～21週間の範囲であっ

た。

表1は移植に用いた成体ラット数と新生仔数（皮下及び経口のシクロスポリン処置をした及びしないの両方）並びに各ラット群の移植後生残時間に関するデータを要約する（左欄と中央欄）。生存能力のあるNT2N移植片を有するラット数は最右欄に示す。皮下（s.c.）シクロスポリン処置したラット数は括弧内に示す。

免疫組織化学的操作：

組織処理方法と光学顕微鏡による免疫組織化学的分析方法とは周知である。NT2N移植片の免疫組織化学的特徴づけのために、抗体を用いた。ニューロン又はグリアの表現型の分子識別特性(molecular signature)として役立つことが判明しているニューロン及びグリアの細胞骨格タンパク質その他のポリペプチドに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方を、NT2N移植片を同定し、特徴づけるために選択した。これらの抗体を詳細に特徴づけ、それらの性質を表2に要約する。

詳しくは、表2はこの研究に用いた27種類の抗体と、ラット脳に移植したNT2N細胞とのそれらの反応性とを要約する。最左欄は第2欄に挙げた抗体によって認識されるポリペプチドを示す。第3欄は本明細書に適用するときの各抗体の希釈度又は免疫グロブリン濃度を示す。第4欄は抗体が移植NT2N細胞を染色するか否かを示す（+ 陽性；- 陰性；+/- 弱い又は不明確な染色）。抗体は、それらが主として又は排他的に発現される細胞種類に応じて、類別する。

表2の第1欄に用いる略号（アルファベット順）：

G F A P = グリア原繊維酸性タンパク質；

M A P 2 = マクロチューブ関連タンパク質2；

M A P 5 = マクロチューブ関連タンパク質5；

M B P = ミエリン塩基性タンパク質；

N - C A M = 神経細胞接着分子；

N F = ニューロフィラメント；

N F - L = 低分子量 N F タンパク質；

NF-M = 中分子量 NF タンパク質；

NF-H = 高分子量 NF タンパク質；

p75^N GFR = 低アフィニティ (75 kD) 神経成長因子受容体；

P^{ind} = NF-L 又は NF-H 中のリン酸塩独立性エピトープ；

P⁻ = NF-H 又は NF-M 中の非ホスホリル化又は弱ホスホリル化エピトープ；

P⁺ = NF-H 中の中程度ホスホリル化エピトープ；

P⁺⁺⁺ = NF-H 中の高度ホスホリル化エピトープ；

PHF = アルツハイマー病神経繊維タングル中のペアードヘリカルフィラメント

タウタンパク質に対する 2 抗体（すなわち、T3P と PHF1）が胎児タウと、PHF（A68 タンパク質としても知られる）中の異常ホスホリル化タウタンパク質（441 アミノ酸長さタウタンパク質のナンバーリング系によってセリン番号 396 における）とを認識するが、正常な成体タウは認識しないことに注目のこと。また、抗 CFAF と抗マクロファージ MAb が、移植片に浸透した、偶発的な反応性星状膠細胞とマクロファージとをそれぞれ染色したが、NT2N 細胞自体はこれらの MAb によって染色されなかったことに注目のこと。

結果

モノクローナル抗体による NT2N 移植片の特異的同定：

図 1A と図 1B とは、移植後 4 週間目の海馬（歯状回と多形細胞層）における NT2N 移植片の顕微鏡写真を含む。図 1A は NT2N 移植片の Cresyl Violet 染色切片の低倍率図を示す（矢印によって輪郭表示）。図 1B はヒト特異的抗 N-CAM MAb (MOC1) によって染色した同じ NT2N 移植片の低倍率図を示す。星印は NT2N ニューロンの、細胞質と単純な樹状突起樹 (dendritic arbor) とを含む移植片部分の上方に存在し、矢印ヘッドは、移植片から発出して、CA3 の錐体ニューロンの背側の苔状繊維経路に達する軸索を同定する。星印によって同定される領域を図 1C に高倍率で示し、中央矢印の下方にある移植片誘導軸索セグメントは図 1D に高倍率で示す。NT2N ニューロン

とそれらの突起 (processes) のみがこの MAb によって染色されることに注目のこと。図 1 A と図 1 B とは同じ倍率であり、図 1 A におけるバーは $100\mu\text{m}$ である。図 1 C と図 1 D とはヒト特異的抗 N-CAM MAb (MOC1) によって染色した NT2N 移植片のより高い倍率図である。NT2N ニューロンとそれらの樹状突起の一部 (図 1 C) 並びにそれらの軸索 (図 1 D) が染色されるが、内因的齧菌類 N-CAM が染色されないことに注目のこと。図 1 C、図 1 F、図 1 G 及び図 1 H の顕微鏡写真は全て同じ倍率であり、図 1 C におけるバーは $100\mu\text{m}$ であるが、図 1 D と図 1 E とはやや大きい倍率で撮影したものであり、図 1 C におけるバーは図 1 D と図 1 E とにおける $25\mu\text{m}$ に相当する。図 1 E と図 1 F とは、それぞれ、図 1 C 及び図 1 D に図示した領域と同じ領域を示し、隣接切片において、弱ホスホリル化 NF-H/M に対する MAb RHdO20 によって染色され (図 1 D)、NF-H の中程度ホスホリル化イソフォーム (isoform) に対する MAb HO14 によって染色されている (図 1 F)。図 1 G は、内因的ラット軸索のみを染色し、RMO24 がヒト NF-H も認識すると言う事実にも拘わらず NT2N 移植片 (矢印) を染色しない、高ホスホリル化 NF-H に対する MAb (RMO24) によって得られた結果を示す。図 1 H に示した切片は図 1 F に示した切片に隣接し、これは GFAP に対する MAb によって実証された。一部の反応性星状膠細胞は、ラット脳に移植された脊髄神経節移植片のコロニー化と同様に、移植片に浸透するが、大部分の GFAP 陽性反応性星状膠細胞は移植片を囲む。図 1 B ~ 図 1 H の切片はヘマトキシリンによって軽度に対比染色した。

図 2 A、図 2 B、図 2 C 及び図 2 D は、移植後 2 ~ 4 週間目の Cresyl Violet によって染色した (図 2 A、図 2 C 及び図 2 D) 及びマクロファージに対して MAb (ED1) によって染色した (図 2 B)、皮質下白質中 (図 2 A、図 2 B 及び図 2 D) 及び背側間脳中 (図 2 C) の 3 種類の NT2N 移植片の顕微鏡写真を示す。図 2 A と図 2 B とは同じ移植片の隣接切片であり、矢印ヘッドは移植片 (上方) と直下白質 (下方) との界面を同定する。図 2 A と図 2 B とは同じ倍率であり、図 2 A 中のバーは $50\mu\text{m}$ である。図 2 B の矢印は、限局性

核崩壊を受けた幾つかのNT2Nニューロンを含む移植片部分のED1陽性マクロファージ(EDI positive macrophage)を同定する。移植片の縁(星印)における図2Cの血管の周囲(矢印)にはより広範囲な炎症が見られ、図2Dに示す他の皮質下白質NT2N移植片には、移植されたNT2N細胞のより重度な核崩壊が見られ、図2Dでは矢印が核破片の蓄積を同定する。図2Cと図2Dは異なる倍率であり、図2Aのバーは図2Cにおける $100\mu\text{m}$ と、図2Dにおける $30\mu\text{m}$ とに相当する。

図3A、図3B、図3C、図3D、図3E、図3F、図3G及び図3Hは、MAbによって検出され、ヘマトキシリンによって対比染色された移植後4週間目の皮質下白質におけるNT2N移植片の顕微鏡写真を含む。図3Aに示す切片はヒト特異的抗NF-H MAb(HO14)によって染色したものであり、図の右側にNT2N移植片中の移植された細胞質とそれらの樹状突起とを示す。標識された軸索は移植片部位からこのパネルの左側までの中央に伸びる。これらの軸索が脳梁内の中線(星印)を横切ること注目すること。図3Aに示す切片に隣接した切片である図3Bの切片は、ヒトN-CAMに対するMAb(MOC1)によって調べたものであり、このMAbはこの図の右側に移植片中のNT2N細胞の細胞体樹状突起(somatodendritic)ドメインと、脳梁内の左側に中線(星印)を横切る軸索とを染色する。図3Aと図3Bとは同じ倍率であり、図3A中のバーは $100\mu\text{m}$ を表す。図3Aと図3Bに見られる脳梁内の軸索は図3Cと図3Dとに、それぞれ、より大きい倍率で示す。これらの軸索(図3Cと図3Dにおける矢印)はNT2N移植片の反対側の半球に、中線(図3Cと図3Dにおける星印)を横切る。図3Cと図3Dとは異なる倍率であり、図3Cにおけるバーは $100\mu\text{m}$ であり、同じバーが図3Dでは $50\mu\text{m}$ に相当する。図3Eでは、MAP2に対するMAb(AP14)が移植されたNT2Nニューロンのソマト樹状ドメインを標識する。移植片の細胞体部(cell body mass)は星印によって同定され、上部(overlying)白質(WM)は染色されない。上部皮質内の内因的宿主ニューロンのソマト樹状ドメインもこの切片において標識され、この倍率では先端樹状突起(apical dendrite)が最も顕著である。図3Eは図3A及び図3Bと

同じ倍率である。図3 Fでは、高ホスホリル化NF-Hに対するMA b (RHO 24) は移植片中のNT2 Nニューロン及びそれらの突起を染色しない(星印)。しかし、周囲白質(WM)中の内因的軸索はこのMA bによって標識され、それによって、この移植片の細胞体部の範囲と樹状突起との輪郭を明確にする。図3 Fのバーは100 μ mである。図3 Gと図3 Hとに示す2つの顕微鏡写真は抗NF-L抗血清によって(図3 G)と、NF-Hの中程度ホスホリル化イソフォームに対するMA b (TA51)によって(図3 H)染色された、隣接切片におけるNT2 N移植片の高倍率図である。NT2 Nニューロンの多くがそれらの細胞質と突起とにおいて免疫反応性NF-LとNF-Hとを含む(それぞれ、図3 Gと図3 Hにおける矢印)ことに注目のこと。さらに、白質における内因的髒菌類軸索(図3 Gと図3 Hとの上部左)もこれらの抗体によって標識される。図3 Gと図3 Hとは同じ倍率であり、図3 Fにおけるバーは図3 Gと図3 Hとにおける50 μ mに相当する。

Cresyl Violetによって染色された切片(図1 A)図2 A、図2 B及び図2 D)において移植片を認識することができるが、髒菌類CNS中の移植NT2 N細胞の同定は、ある一定のポリペプチド又はこれらのポリペプチドの一部に含まれるエピトープの、ヒト対ラット及び成熟対未成熟CNSニューロンへの限定を利用することによって非常に促進された。例えば、MOC1、ヒト神経細胞接着分子(N-CAM)に対するモノクローナル抗体(MA b)はヒトNT2 Nニューロン中のN-CAMを認識するが、ラットCNS中のN-CAMを認識しないことが判明した(図1 B～図1 D)。実際に、NT2 N細胞の細胞学(cytology)は、免疫組織化学を用いずに、NT2 N細胞の認識を可能にするほど十分に特徴的ではない。さらに、NT2 N移植片に由来する軸索は、それらを本明細書に述べるヒト特異的抗体によって標識する場合に初めて、移植片誘導されたと同定可能であった(図1 B、図1 F、図3 A～図3 D)。抗N-CAM MA bの他に、移植NT2 N細胞は、髒菌類CNS中ではなく、ヒトCNS中及びNT2 N細胞中の中(NF-M)分子量(Mr)ニューロフィラメント(NF)サブユニットの中程度ホスホリル化イソフォームを認識する抗体、MA b HO

14によっても特異的に同定することができた(図1F)。これとは対照的に、両方が、成熟CNSニューロンにのみ発現する高(NF-H)Mr NFサブユニットの最も重度にホスホリル化されたイソフォームに対するMAbであるRMO24(図1G)とRMO217とは、齧歯類CNSニューロン中のNF-Hを免疫染色したが、これらのMAbは本明細書で述べる移植片中のヒトNT2N細胞を染色しなかった。RMO24とRMO217の両方は完全に成熟したヒトCNSから抽出されたホスホリル化NF-Hを認識するので、これらのMAbが移植されたNT2N細胞を染色できないことは、移植NT2N細胞中のNF-Hの不完全ホスホリル化(これらの移植ニューロンの不完全成熟を表す)を反映すると考えられる。NT2N細胞が免疫不全ヌードマウス脳中で長期間(すなわち、>6か月)生存することができるならば、移植されたNT2NニューロンはNF-Hの最も重度にホスホリル化されたイソフォームを得て、これらの完全成熟移植ニューロンはRMO24とRMO217によって標識される。しかし、移植NT2N細胞は<4か月の移植後生存期間に関して本明細書で初めて研究され、RMO24とRMO217の両方はラットCNSニューロンを強度に染色したが、移植NT2N細胞を染色せず、MOC1とHO14とはNT2N移植片を特異的にかつ強度に染色したが、ラットCNSニューロン又は他のラットCNS細胞を染色しなかった。したがって、全体で4種のこれらのMAbを用いて、生残するNT2N移植片を特異的に同定するために、NT2N細胞の移植片を受容した全体で68匹のラットからの切片を選別した。さらに、グリア原繊維酸性タンパク質(GFAP)に対するMAb(2.2B10)は移植片を囲む反応性星状膠細胞を染色し(図1H)、このことはNT2N移植片の範囲を明確にするためにも役立った。これらの反応性星状膠細胞の一部は、ラット脳に移植された反応性星状膠細胞による後根神経節移植片のコロニー化と同様に、NT2N移植片に浸透した(図1H)。MAbのこのパネルによって移植片部位を選別することは、NT2N細胞が軟膜中に又は、移植部位に背側の針トラック(needle track dorsal to the injection site)中に閉じ込められた小塊として存在する場合にも、移植されたNT2N細胞を同定するための非常に効果的な方法を提供した。

移植されたNT2N細胞の生存：

移植されたNT2N細胞の殆ど全ては新皮質、直下白質及び海馬中に正確に注入されたが、間脳、側脳室中に又は、新皮質移植部位の上方の軟膜内にも若干のNT2N細胞が検出された。移植NT2N細胞の数と性質(disposition)とはラットによって変化した。NT2N移植片は、シクロスポリン処置なしに2週間まで生存した成体ラット(N=5)及び新生仔ラット(N=5)の100%において免疫組織化学的に同定された(NT2N移植片生存に関するこれらのデータ及び下記データの要約に関しては表1を参照のこと)。生存可能なNT2N移植片を有するラットのこの群は、予め凍結したNT2N細胞のアリコートで移植された、シクロスポリン処置済み2ラットを含有した。次の移植後の生存期間においては、すなわち4週間目には、シクロスポリン処置しなかった、成体ラット10/24と新生仔ラット2/2とがNT2N脳移植片を含有し(表1)、移植片のNissl染色標本において、移植された細胞の多くは形態学的かつ組織化学的に小星状(stellate)ニューロンに類似した。しかし、次の移植後の生存期間には、シクロスポリン処置しなかった、19匹の成体ラット又は新生仔ラットの中の1匹のみが同定可能な、生存NT2Nニューロンを含有した。これらの所見は、移植されたNT2N細胞によるN-CAMとNFタンパク質との停止(cessation)よりもむしろNT2N移植片の拒絶を表す。

この結論は下記4理由に基づく：

(1) 移植後2週間程度では、生存可能な移植片の一部において細胞破片と共に炎症性細胞が検出され(図2C)、これらの炎症性細胞の多くはマクロファージ特異性ED1 MA bによってマクロファージと同定された(図2B)；

(2) シクロスポリンはこの薬物を皮下経路によって受容したラットにおける全てのNT2N移植片の生存を延長した；

(3) 移植後2～4週間目に移植片部位に最大数のマクロファージと炎症性細胞が浸透することが認められた；

(4) 免疫不全ヌードマウスでは、移植されたNT2N細胞は>12か月生存し、N-CAMとNFタンパク質とを発現し続け、移植後12か月までにこれら

が完全な成熟ニューロン表現型を得るように徐々に成熟する。

皮下シクロスポリンを受容した5ラット中で、5匹全てが移植後2～12週間の範囲である移植後時間に生存可能なNT2N移植片を含有した。これに反して、同じ投与量（すなわち、7～10mg/kg）での胃管によるシクロスポリン投与は、このようにして処置された8ラット中の2匹のみが同定可能なNT2N移植片を含有したにすぎなかった（表1）、移植片拒絶の防止に効果的ではないように思われた。特に、これらのラットへのシクロスポリン投与は生存するNT2N細胞がある範囲のニューロンポリペプチドを発現する能力に検出可能な影響を及ぼすようには思われなかった。

移植されたNT2N細胞の成熟と、ニューロン極性の確立：

移植後2～4週間生存したNT2N移植片は、それらがインビボで徐々に成熟した結果として、連続切片(serial section)免疫組織化学的分析に対して最大にかつ最も敏感に反応したが、移植後4日から1週間まで生存したラットからは同定可能なNT2N細胞を含有した、限られた数の切片が得られたに過ぎなかった。この理由から、移植後2～4週間生存したラットの成熟状態とNT2N細胞の極性とに研究を集中した。これらの時点において、海馬又は皮質下白質におけるNT2N細胞（恐らく皮質移植部位から上部の蜘蛛膜下空間へのNT2N細胞の漏出のために、新皮質よりも大きいNT2N細胞集団を矛盾なく含有した）は、決定的にNT2N細胞をニューロンと同定する、幾つかの充分に特徴づけられたポリペプチド（例えば、NFサブユニットと、他のニューロン細胞骨格タンパク質、シナプスポリペプチド）を発現した（図3A～3E、図3G）図3H及び表2を参照のこと）。しかし、これらのニューロンは、NF-Hの重度にホスホリル化されたイソフォームを得ることができなかった点で、成体CNSの完全成熟ニューロンではなく、後期胎児ヒト脊髄（すなわち、>25週間在胎齢）又は若い分娩後ヒト小脳（すなわち、<1歳）ニューロンに類似した。これに反して、グリア細胞によって発現されたポリペプチドはこれらの移植片では稀であり、これらの移植片における稀なGFAP陽性星状膠細胞の存在（図1H）は、移植片中への反応性ラット星状膠細胞の移行を明確に表す。

生後4週間のNT2Nニューロンは軸索を数mmにわたって延ばし(図1B～1F)、これらの軸索の一部は移植片部位とは反対側の半球に突出した(図3A～3D)。樹状突起は、ソマト樹状ドメイン(例えば、MAP2)に限定された微小管関連タンパク質(MAP)に対する抗体によって標識されることができるので、容易に同定されたが、これらの樹状突起は短く、単純な分枝パターンを有した(図3E)。それにも拘わらず、インビボにおける明確なラット又はヒトのニューロンにおける対応物と同様に区画分けされたポリペプチドを含む、同定可能な軸索と樹状突起との存在(図1B～1F、図3A～3E、図3G及び図3H)は、移植後4週間までに移植NT2Nニューロンが、インビボにおけるほぼ成熟したヒトCNSニューロンに見られる分子表現型と構造極性とを得ていることを実証する。さらに、移植NT2N細胞のいずれも、ニューロン前駆細胞又は非常に未熟な(すなわち、“新生(nascent)”)ヒトCNSニューロン中に見られるタンパク質(例えば、ナスチン、ビメンチン、p75NGFR)を発現しなかった。重要なことには、移植片拒絶によるニューロン変性の証拠(図2A～2D)にも拘わらず、移植片のいずれも通常の神経変性疾患に見られると同様なニューロン細胞骨格タンパク質異常の証拠を示さなかった。最後に、生存するNT2N細胞が腫瘍性表現型に帰属する(reverted)ことを実証する証拠(例えば、有糸分裂、転移)は存在しなかった。

この研究は、徐々に正常に成熟して、腫瘍形成の証拠なしに、宿主哺乳動物の脳に組み込まれることができる、クローナルヒトニューロン様の純粋な細胞集団のCNS移植片の性質を実証する。唯一の他のCNS細胞ライン(ヒトHCN-1ライン)が、このニューロン系統(neuronal lineage)への排他的なインビトロ傾向(commitment)を示すように思われるが、この細胞ラインは実験動物の脳に移植されたときに安定なニューロン表現型を維持しなかった(Ronnett, C. V. 等, 1990, Science 248:603～605)。

移植に適したニューロン細胞ラインが不足していることは、移植されたニューロンのみに対するCNSの免疫応答の研究を制限している。この報告は、NT2Nニューロンが、移植後約4週間までに拒絶を誘導する抗原を発現することがで

きることを実証する。NT2N細胞におけるこれらの抗原の正確な性質はこの時点では不明であるが、NT2親細胞ラインに類似したヒト奇形癌細胞ラインは例えばHLA-A、B及びC抗原と、 β_2 ミクログロブリンのような、主要な組織適合性抗原を発現することが判明している。

さらに重要なことには、この研究は、移植されたNT2Nニューロンがラット脳において部分的に(partial)ニューロン成熟することができることを実証する。ラット脳に移植されたNT2N細胞は、Replate 3後28日間まで培養中に維持された、それらのインビトロ対応物とほぼ同じ程度までに徐々に成熟した。しかし、これらは免疫不全ヌードマウス脳中で>9~12か月間生存した移植NT2N細胞と同じ成熟度レベルに達しなかった。特に、ラット脳中のNT2N移植片は移植後4週間までに、後期胎児脊髄又は未熟な、若い出生後小脳中の確実なヒトニューロンの成熟状態に相当する成熟レベルにまで進行した。これらは嗅覚ニューロン及びCNS髄芽細胞腫のニューロン様腫瘍細胞とは有意に異なる。しかし、移植され、培養されたNT2N細胞は、一部の奇形癌及び多くの奇形腫中でその場で観察された、分化し、かなり成熟したニューロンに類似する。

ここに述べる研究結果に基づくと、NT2N細胞の実験動物への移植は、ニューロンの発達の生物学と一部の神経障害において生ずる退行的神経変性現象との数種類の特有の研究に利用することができる。第一に、齧歯類の脳の種々な領域にNT2N細胞を移植することによって、ニューロン成熟とニューロン極性発達とのプロセスを“再開始”できることは、これらの2種類の重要な、発達の調節されるプロセスのモデルとして利用することができる。対照付き(controlled)実験設定でこれらのプロセスを研究するために有効なヒトモデル系の入手可能性が、これらのプロセスを支配する調節機構を理解する試みを非常に容易にする筈である。このモデル系はまた、宿主の脳のマクロ環境が種々な神経解剖学的な部位に移植されたNT2N細胞を誘導して、領域特異的な形態学的及び神経伝達物質の表現型を取らせる可能性を追及する機会を与えられよう。

さらに、野生型の又は遺伝的に修飾されたNT2N細胞を利用して、ヒト疾患、症状及び障害、特に神経系疾患の動物モデルを開発することができる。例えば、

NT2N細胞は695アミノ酸長さアミロイド先駆体タンパク質 (APP₆₉₅) を選択的に発現し、培地中に β /A4ペプチドを分泌する。それ故、移植後に細胞外スペースにAPP₆₉₅又は β /A4を放出する動物モデルを形成するために、野生型NT2N細胞、APP₆₉₅を過度に発現する(overexpress)ようにトランスフェクトしたNT2N細胞、又は β /A4を過度に発現するようにトランスフェクトしたNT2N細胞を移植することができる。アルツハイマー病の脳において生ずる β /A4ペプチド沈着をこのようにしてモデル化することができる。

バイオアクティブ分子を産生するように遺伝的に操作されたNT2N細胞の移植を利用して、ヒト神経変性疾患の治療のために血液-脳バリアーを迂回する(circumvent)新規な方法を開発することができる。例えば、パーキンソン病の治療のための胎児中脳移植片を用いる最近の研究によって実証される治療的見込みに関して、パーキンソン病の治療に用いるためのドーパミン作動性表現型を得るようにNT2N細胞を誘導してから移植することは、パーキンソン病に罹患していると疑われる個体の治療法であることができる。

実施例 2

β -ガラクトシダーゼのトランスフェクションと染色：

ヒト奇形癌細胞ラインからの高度に精製したニューロン集団を米国特許第5, 175, 103号に記載の通りに得た。未分化であるときに、NT2細胞をLIPOFECTINトランスフェクティング(transfecting)試薬(Bethesda Research Laboratories)を用いるリポフェクション(lipofection)によって、SPUD1 100 μ gとpSV2neo 10 μ gとでトランスフェクトした。SPUD1は、SV40プロモーターを用いる β -ガラクトシダーゼ発現ベクターであり、上流と下流にMoloneyネズミ白血病ウイルスLTR(long terminal repeat)を有する。完全培地中で2日間後に、トランスフェクタント(transfectant)をG418(Gibco) 200 μ g/mlによって7日間選択した。リン酸塩緩衝化生理食塩水(pH7.4)中の2%パラホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド中で固定した後に、細胞をPBS中のX-gal 1mg/mlと、5mMフェロシアン化カリウムと、5

mMフェリシアン化カリウムと、2 mM $MgCl_2$ とによって β -ガラクトシダーゼ活性に関して染色した。 β -gal陽性培養物を2回サブクローン化し(subcloned)、これらのサブクローン(subclone)をさらに研究するために用いた。青色反応生成物とプロセス(process)との同時可視化を可能にするためにHoffmanモジュレーションコントラスト(modulation contrast)を用いて、細胞を撮影した。

未分化細胞と有糸分裂後細胞との両方に β -ガラクトシダーゼ(β -gal)発現プラスミドが存在することが判明した。したがって、発現プラスミドの未分化細胞中へのトランスフェクションは外因的遺伝物質の細胞中への導入を可能にする。次に、細胞を安定な、有糸分裂後ヒトニューロンになるように誘導することができ、細胞は外因的遺伝物質を発現することができる。

表 1

移植したNT2N細胞の移植後の生存データ

移植後 生存時間	w/NT2N細胞移植 ラット数	生存可能なNT2N細胞 移植片を含むラット数
	<u>成体非処置ラット</u>	
4日間	3	3
2週間	2	2
4週間	24	10
6週間	4	0
8週間	3	1
13週間	2	0
	小計 = 38	小計 = 16
	<u>新生仔非処置ラット</u>	
1週間	2	2
2週間	3	3
4週間	2	2
8週間	2	0
12週間	2	0
16週間	2	0
16週間	2	0
21週間	2	0
	小計 = 17	小計 = 7

表1 (続き)

移植後 生存時間	w/NT2N細胞移植 ラット数	生存可能なNT2N細胞 移植片を含むラット数
成体シクロスポリン処置ラット		
2週間	3 (s c = 1)	3 (s c = 1)
4週間	1 (s c)	1
6週間	1 (s c)	1
8週間	2 (s c = 1)	1 (s c = 1)
10週間	2	0
11週間	3	0
12週間	1 (s c)	1
	小計 = 13	小計 = 7
	総計 = 68	総計 = 30

表2

ポリペプチド、抗体の特異性及びそれらの移植NT2N細胞との反応性

ポリペプチド	抗体	希釈 $\mu\text{g}/\text{ml}$	NT2N 移植片
ニューロン			
グラスリン鎖	LCB2	0.1	+/-
MAP2	AP14	1:100	+
MAP5	AA6	1:1500	+
NF-H, P ⁺⁺⁺	RMO24	ニート (Neat)	-
NF-H, P ⁺⁺⁺	RMO217	ニート	-
NF-H, P ⁺	TA51	1:20	+
NF-H/M, P ⁺	RMdO20	1:10	+
NF-H, P ⁺⁺	HO14	1:25	+
NF-M, p ^{ind}	RMO254	1:25	+
NF-L, p ^{ind}	NR 4	1:10	+
NF-L, p ^{ind}	Anti-NF-L	1:50	+
ニューロン特異性タンパク質	NST11	1:10	-
タンパク質キナーゼ C γ	PKC66	ニート	-
Tau	T14	ニート	+
Tau	134	1:500	+/-
Tau (胎児 / PHF)	T3P	1:50	+
Tau (胎児 / PHF)	PHF1	1:2000	+/-

表2 (続き)

ポリペプチド	抗体	希釈 $\mu\text{g}/\text{ml}$	NT2N 移植片
ニューロンと神経内分泌細胞			
クロモグラニン	LK210	1:500	—
シナプトフィシン	SY38	1:100	+ / —
チロシンヒドロキシラーゼ	抗TH	1:100	—
神経上皮幹細胞			
ネスチン	抗ネスチン	1:2000	—
グリア細胞			
GFAP	2.2B10	1:500	—
MBP	抗MBP	1:100	—
神経細胞、間脳細胞、その他の細胞			
N-CAM	MOC1	1:10	+
p75NGFR	Me20.4	1:100	—
ビメンチン	V9	1:100	—
マクロファージマーカー	ED1	1:500	—

【図 1】

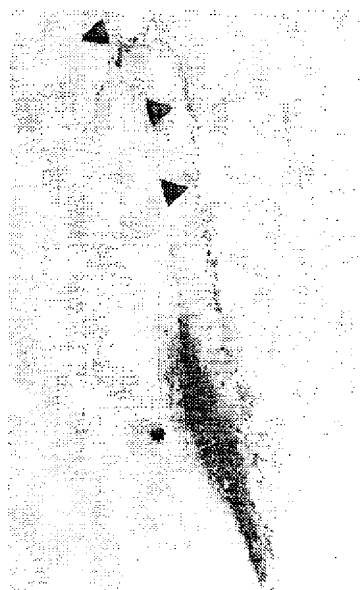


FIG. 1B

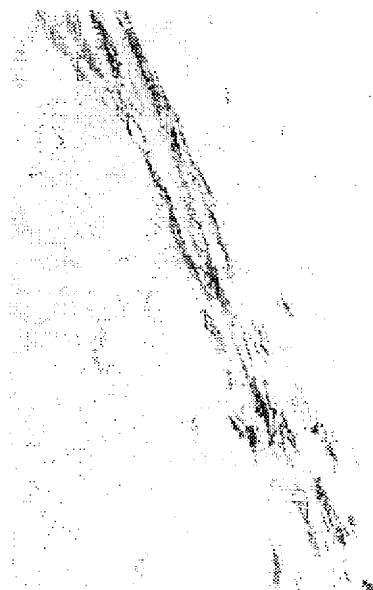


FIG. 1D

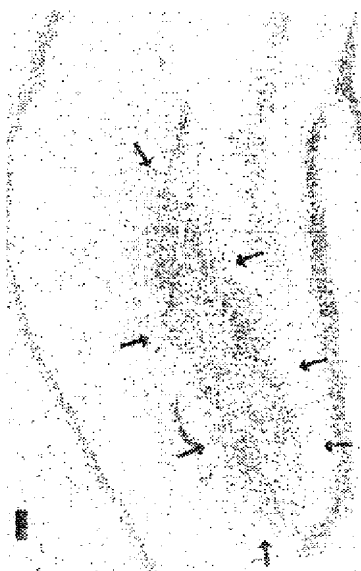


FIG. 1A

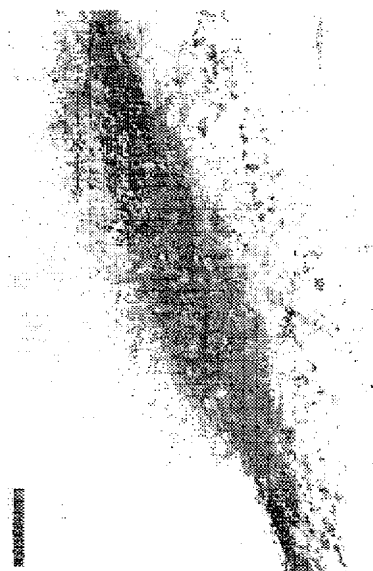


FIG. 1C

【図 1】



FIG. 1E



FIG. 1F

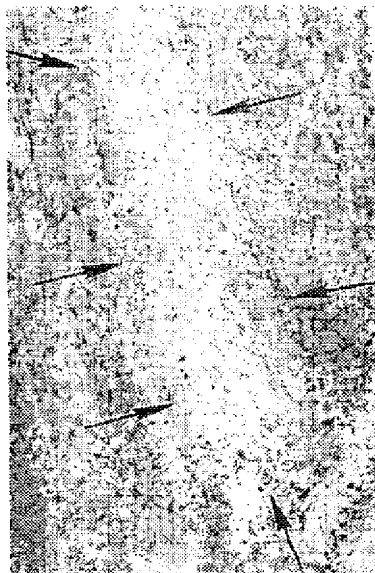


FIG. 1G

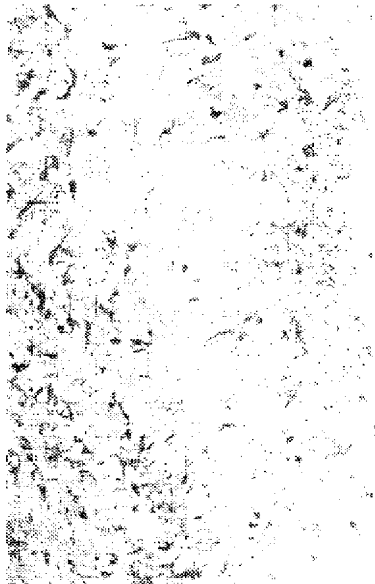


FIG. 1H

【図2】



FIG. 2A

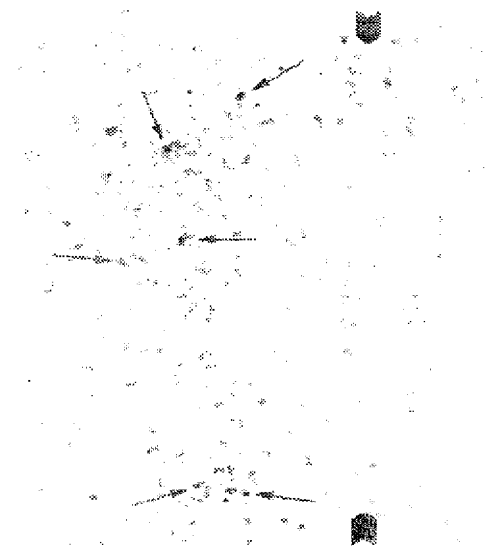


FIG. 2B

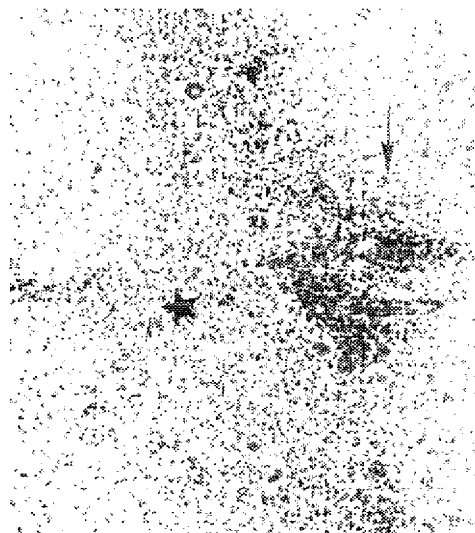


FIG. 2C



FIG. 2D

【図3】

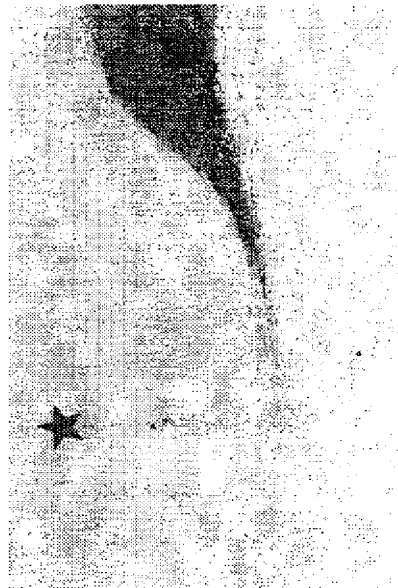


FIG. 3B

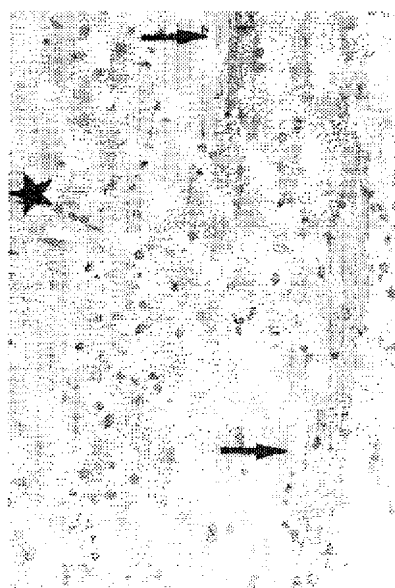


FIG. 3D



FIG. 3A

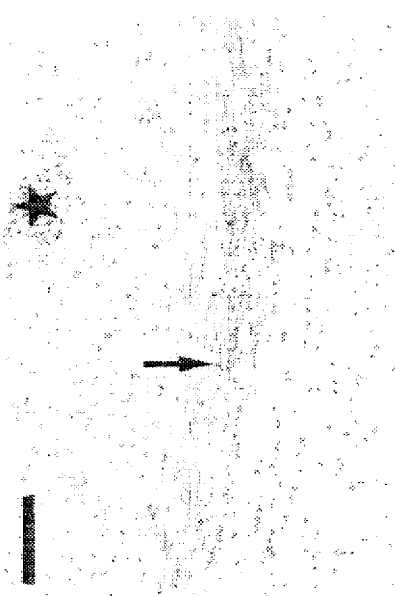


FIG. 3C

【図3】

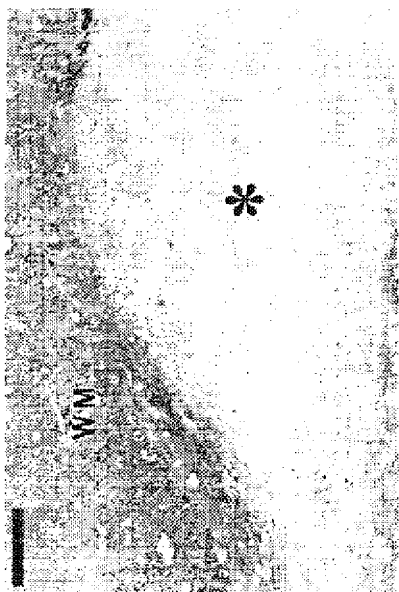


FIG. 3F

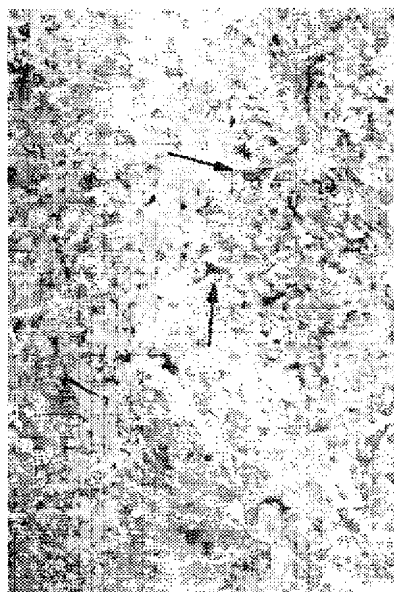


FIG. 3H

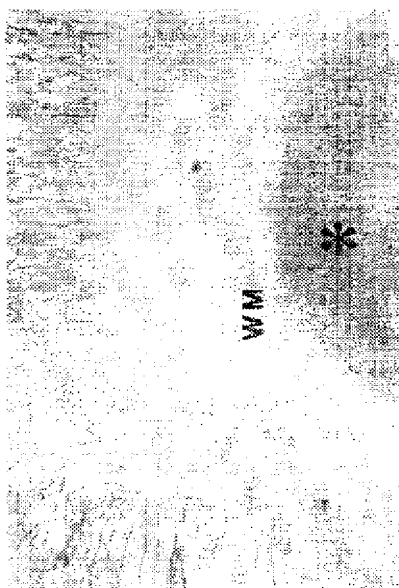


FIG. 3E

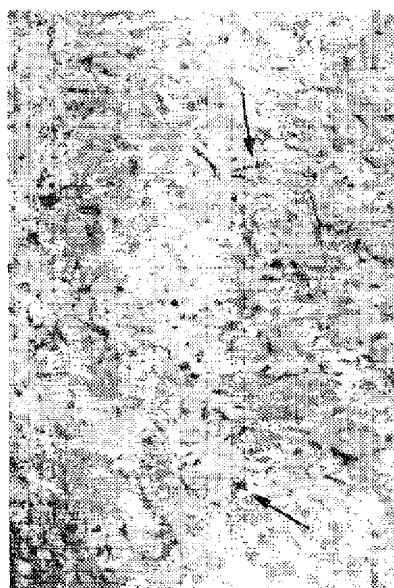


FIG. 3G

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/12899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : A01N 63/00; A61K 48/00; C12N 5/00, 5/06, 5/08, 15/00 US CL : 424/9, 93.1, 93.2, 93.7; 435/172.1, 172.3, 240.2, 240.1. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/9, 93.1, 93.2, 93.7; 435/172.1, 172.3, 240.2, 240.1. Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 5,175,103 (LEE ET AL.) 29 DECEMBER 1992, see entire document.	1-9 and 21-24
Y	US, A, 5,180,820 (BARDE ET AL.) 19 JANUARY 1993, see entire document.	1-9 and 21-24
Y	US, A, 4,892,538 (AEBISCHER ET AL.) 09 JANUARY 1990, see entire document.	1-9, 21-24
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, Volume 86, issued June 1989, P. Ernfors et al., "A cell line producing recombinant nerve growth factor evokes growth responses in intrinsic and grafted central cholinergic neurons", pages 4756-4760, see entire document.	1-9 and 21-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 JANUARY 1995		Date of mailing of the international search report 13 FEB 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer BRIAN R. STANTON <i>B. Stanton</i> Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/12899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, Volume 327, Number 22, issued 26 November 1992, C. R. Freed et al., "Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for parkinson's disease", pages 1549-1555, see entire document.	1-9 and 21-24.
Y	THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, Volume 327, Number 22, issued 26 November 1992, D.D. Spencer et al., "Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with parkinson's disease", pages 1541-1548, see entire document.	1-9 and 21-24
X ---	EXPERIMENTAL NEUROLOGY, Volume 122, issued August 1993, J.W. Trojanowski et al., "Neurons derived from a human teratocarcinoma cell line establish molecular and structural polarity following transplantation into the rodent brain", pages 283-294, see entire document.	1-3, 6, 7 -----
Y		5, 8, 9 and 21-24
Y	NATURE, Volume 362, issued 01 April 1993, S. Jiao et al., "Long-term correction of rat model of Parkinson's disease by gene therapy", pages 450-453, see entire document.	1-9 and 21-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/12899

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

Databases: APS, AQUASCI, BIOBUSINESS, BIOSIS, BIOTECHDS, CA, CABA, CANCERLIT, CAPREVIEWS, CEN, CIN, CJACS, CJELSEVIER, CONFSCI, DISSABS, DRUGB, DRUGLAUNCH, DRUGNL, DRUGU, EMBASE, FSTA, GENBANK, HEALSAFE, IFIPAT, JICST-E, JPNEWS, LIFESCI, MEDLINE, NTIS, OCEAN, PHIC, PHIN, PROMT, SCISEARCH, TOXLINE, TOXLIT, USPATFULL
Search Terms: Lee?/au; neuro?; nt2n; implant?; transfect?; brain; derived; neurotrophic; bdnf; bdnf; basic; fibroblast?; glial?; alzheimer?; parkinson?; huntington?; transplant?; cell?

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-9 and 21-24, drawn to methods of treating neurological disorders.

Group II, claims 10-16, drawn to methods of preparing animal model systems.

Group III, claims 17-20, drawn to non-human animals.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of groups I and II are distinct, one from the other, because they represent materially different methods of using cellular compositions. In the case of the invention of group I, the cells are used to treat neurologic disorders. Therefore, the cellular compositions are required to ameliorate disease conditions. In the case of the invention of group II, the cells administered to the animal are used to induce a disease condition in the host. Therefore, two disparate and diametrically opposite uses of cellular compositions are indicated by the two claimed inventions.

The animals of the invention of group III are distinct from the invention of group I because said animals represent a distinct composition from that claimed by the latter invention. In the case of group I, cellular compositions are claimed whereas in the case of group III, modified multicellular animals are claimed.

The methods of the invention of group II are distinct from the animals of the invention of group III because the former methods are drawn to means of producing animal models of disease and therefore require search and consideration of disease systems. In contrast, the animals of the invention of group III are not required to comprise any model systems and therefore consideration of disease states, per se, is not required.

For the preceding reasons, the above listed inventions are not so linked by any special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 so as to form a single inventive concept.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	片内整理番号	F I		
A 6 1 K 38/27		9051-4C	A 6 1 K 37/36		
C 1 2 N 5/10		9051-4C	37/24		
15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00		A
C 1 2 P 21/02		9281-4B	5/00		B

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成14年3月19日(2002.3.19)

【公表番号】特表平9-505054

【公表日】平成9年5月20日(1997.5.20)

【年通号数】

【出願番号】特願平7-513971

【国際特許分類第7版】

A61K 48/00 AAB

A01K 67/027

A61K 35/30

38/00 AAM

38/22

38/27

C12N 5/10

15/09

C12P 21/02

【F I】

A61K 48/00 AAB

A01K 67/027

A61K 35/30

C12P 21/02 C

A61K 37/02 AAM

37/36

37/24

C12N 15/00 A

5/00 B

手 続 補 正 書

平成18年10月23日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成7年特許願第133471号

2. 補正をする者

名 称 ザ・トクスティス・オブ・ザ・ユニバーシティ・
 オブ・ペンシルバニア

3. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
 新大手町ビル 206室
 ユアサハラ法律特許事務所
電 話 3370-6641～6345
氏 名 (8970) 弁理士 社 名 一 夫

4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

明細書の通り

動成長因子（bDNF）及びグリア誘導成長因子のような、神経栄養物質とから成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項6記載の発明組成物。

10. 中枢神経系疾患又は障害の非ヒト動物モデルの作製方法であって、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを前記動物の脳に移植する工程を含む方法。

11. 前記ニューロンがNT2N細胞である、請求項10記載の方法。
12. 前記ニューロンが外因的遺伝物質によってトランスフェクトされたトランスフェクト済み分化NT2N細胞であり、トランスフェクト済み細胞が前記外因的遺伝物質のコーディング配列を発現して、タンパク質産物を産生する、請求項10記載の方法。

18. 前記外因的遺伝物質が正常及び突然変異アミロイド前駆体、セナーゼ、ホスファターゼ、正常及び突然変異スーパーオキシドジスムターゼ、ニューロフィラメントタンパク質並びにアポリポタンパク質4から成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項10記載の方法。

14. 前記疾患又は障害がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチングタン病、発作及び神経損傷から成る群から選択される、請求項10記載の方法。

15. 前記動物が霊長類である、請求項10記載の方法。

16. 前記動物が発達遅延障害病態であり、前記細胞の移植前、中及び/後に前記細胞にシクロスポリンを投与する工程をさらに含む、請求項10記載の方法。

17. 前ヒト動物の脳に移植された、少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを含む非ヒト動物。

18. 前記ニューロンがNT2N細胞である、請求項17記載の非ヒト動物。

19. 前記ニューロンが外因的遺伝物質によってトランスフェクトされたNT2N細胞であり、トランスフェクト済み細胞が前記外因的遺伝物質のコーディング配列を発現して、タンパク質産物を産生する、請求項17記載の非ヒト動物。

20. 前記外因的遺伝物質が正常及び突然変異アミロイド前駆体、セナーゼ、

（別 紙）
請求の範囲を次のとおり補正する。

「1. 中枢神経系の疾患又は障害に罹患していると疑われるヒト以外の動物の治療方法であって、

少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを前記動物の脳に移植する工程を含む方法。

2. 前記ニューロンが分化したNT2N細胞である、請求項1記載の方法。
3. 前記ニューロンが外因的遺伝物質によってトランスフェクトされたトランスフェクト済み分化NT2N細胞であり、トランスフェクト済み分化細胞が前記外因的遺伝物質のコーディング配列を発現して、タンパク質産物を産生する、請求項1記載の方法。

4. 前記外因的遺伝物質が神経伝達物質と、例えば神経成長因子、脳源性神経栄養因子（BDNF）、神経栄養因子神経成長因子（bDNF）及びグリア誘導成長因子のような、神経栄養物質とから成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項3記載の方法。

5. 前記中枢神経系疾患又は障害がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチングタン病、発作及び神経損傷から成る群から選択される、請求項1記載の方法。

6. 少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルと、薬理的に感受される増殖を含む発芽組成物。

7. 前記ニューロンが分化したNT2N細胞である、請求項6記載の発芽組成物。

8. 前記ニューロンが外因的遺伝物質によってトランスフェクトされたトランスフェクト済み分化NT2N細胞であり、トランスフェクト済み分化細胞が前記外因的遺伝物質のコーディング配列を発現して、タンパク質産物を産生する、請求項6記載の発芽組成物。

9. 前記外因的遺伝物質が神経伝達物質（例えば、セロトニン、ドパミン、アセチルコリン）と、例えば神経成長因子、神経栄養因子（BDNF）、神経栄養因子

ホスファターゼ、正常及び突然変異スーパーオキシドジスムターゼ、ニューロフィラメントタンパク質並びにアポリポタンパク質4から成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項19記載の非ヒト動物。

21. 神経損傷を特徴とする損傷、疾患又は障害に罹患していると疑われるヒト以外の動物の治療方法であって、

少なくとも95%の純度で、安定かつ均質な有糸分裂後ヒトニューロンの培養物からのサンプルを前記神経損傷の部位に又はこのような部位の近くに移植する工程を含む方法。

22. 前記ニューロンが分化したNT2N細胞である、請求項21記載の方法。

23. 前記損傷が脊髄損傷であり、前記サンプルを前記動物の脊髄に移植する、請求項21記載の方法。

24. 前記損傷が運動ニューロンの損傷である、請求項21記載の方法。」

以 上